

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-046871

(43)Date of publication of application : 22.02.1994

(51)Int.Cl.

C12P 13/00
C12P 13/04
C12P 13/06
C12P 13/08
C12P 13/14
// C12N 9/56
(C12P 13/00
C12R 1:10)
(C12P 13/04
C12R 1:10)
(C12P 13/06
C12R 1:10)
(C12P 13/08
C12R 1:10)
(C12P 13/14
C12R 1:10)

(21)Application number : 04-202685

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 29.07.1992

(72)Inventor : ASANO MINAO
TAKAGI HIROSHI

(54) PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYZATE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a protein hydrolyzate, having high contents of glutamic acid, alanine and glycine, excellent in tastiness under mild conditions and simultaneously solve problems of waste disposal, etc., by treating a keratin-containing protein with an enzyme according to a specific method.

CONSTITUTION: A keratin-containing protein such as bird feather or animal hair is digested with a keratinase [preferably *Bacillus.licheniformis* PWD-1 (ATCC-53757)] and then digested with a carboxypeptidase and/or an aminopeptidase to afford the objective protein hydrolyzate. The keratinase is preferably made to react as a 0.1-10% enzymic solution at 37-45° C for 2-48hr. The carboxypeptidase or aminopeptidase or both in an amount of 0.1-10% are preferably added to the reactional solution and allowed to react therewith at 37° C for 2-48hr.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-46871

(43)公開日 平成6年(1994)2月22日

(51)Int. CL ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/00		8931-4B		
13/04	A	8931-4B		
13/06	C	8931-4B		
	A	8931-4B		
	B	8931-4B		

審査請求 未請求 請求項の数2(全16頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-202635	(71)出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22)出願日	平成4年(1992)7月29日	(72)発明者	浅野 哲夫 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
		(72)発明者	高木 博史 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

(54)【発明の名称】 タンパク質加水分解物の製造法

(57)【要約】

【構成】ケラチン含有タンパク質を中性-アルカリ性の温和な条件下ケラチナーゼを用い、更にカルボキシペプチダーゼ及び/またはアミノペプチダーゼを用いて分解し、グルタミン酸、アラニン、グリシン含有率の高い呈味性に優れたタンパク質加水分解物を得る。

【効果】グルタミン酸、アラニン、グリシン含有率の高い呈味性に優れたタンパク質加水分解物を得ることができる。また、同時に、廃棄物処理の問題、酸分解法に伴う副生成物の問題も解決し得る。

(2)

特開平6-46871

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ケラチン含有タンパク質をケラチナーゼで消化し、続いてカルボキシペプチダーゼ及び/またはアミノペプチダーゼを用いて消化することを特徴とするグルタミン酸、アラニン、グリシン、セリン含有率の高いタンパク質加水分解物の製造法。

【請求項2】 ケラチナーゼが*Bacillus licheniformis* FWD-1由来のものである特許請求の範囲第1項記載のタンパク質加水分解物の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は従来のプロテアーゼのみでは分解の難しいケラチン含有タンパク質を分解し、その加水分解物を製造する方法に関する。さらに詳細には、本発明は産業上多くが廃棄されている、鳥羽毛、獣毛、人毛、などケラチンを含有するタンパク質をケラチンの分解能力に優れている酵素であるケラチナーゼを用いて消化し、さらにカルボキシペプチダーゼやアミノペプチダーゼを用いて消化することにより、天然調味料原料として利用可能な旨味を呈するグルタミン酸、甘味を呈するアラニン、グリシン、セリンの含有率が高いタンパク質加水分解物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ケラチン含有タンパク質の利用用途としては、プロイラー工場より発生するフェザーなどを加圧

2

加熱で加水分解することによる飼料（フェザーミール）の製造法や（特公平4-3935号）、人毛などの酸加水分解物よりシスチンの抽出（後尾勇、現代化学1981年5月号、p.63）が知られている。吸着剤の製造法（特公昭60-15382号）や、半透性膜状物の製造法（特公昭59-38804号）、消臭・脱臭剤組成物（特公昭61-48379号）にはケラチンの酵素処理物の利用が記されている。

【0003】 一般にケラチンは動物組織のうち主として脊椎動物の表皮、毛髪、羽毛、爪、角、蹄、鱗など体の保護を目的とする部分の主成分であり、ほとんどの溶媒に溶けない。いわゆる硬タンパク質のひとつである。ケラチンのアミノ酸組成については表1に示す様に、羽毛（鶏）にセリン、グルタミン酸、プロリンが多く含まれ（B.S.Harrap et al., Biochem. J., 92, 8 (1964)）、人毛にグルタミン酸、セリン、アルギニンが多く含まれ（W.G.Crewther et al., Biopolymers 4, 905(1966)）、羊毛でシスチン、グルタミン酸、セリンの順に含有量が多く含まれていることが知られている（I.J.O'Donnell et al., Aust. J. Biol. Sci., 15, 740 (1962)）。全般的にいて、ケラチンの組成はグリシン、セリン、アラニンなど側鎖の短いアミノ酸の組が40%を示すものとなっている。

【0004】

【表1】

(3)

特開平8-46871

3 ケラチンのアミノ酸組成 (100残基当り残基数)

アミノ酸	羽毛	人毛	羊毛
1/2シスチン	7.8	7.6	11.4
アスパラギン酸	5.6	9.3	8.6
+ アスパラギン			
トレオニン	4.1	5.5	6.1
セリン	14.1	9.0	9.6
グルタミン酸	6.9	16.6	11.3
+ グルタミン			
プロリン	9.8	3.3	6.0
グリシン	13.7	5.2	3.8
アラニン	8.7	6.9	5.5
バリン	7.8	6.1	5.9
メチオニン	6.1	0.4	0.5
イソロイシン	3.2	3.7	3.4
ロイシン	8.8	10.2	7.8
テロジン	1.4	2.5	4.1
フェニルアラニン	3.1	2.0	2.9
リジン	0.6	3.5	3.0
ヒスチジン	0.2	0.7	0.8
アルギニン	3.3	7.2	6.6

【0005】これまでに知られている天然調味料の製造は、タンパク質の分解を経て行われるものが主流であった。天然調味料と称されるもののうち、分解型天然調味料は酸分解型と酵素分解型がある。酸分解型調味料には、大豆、小麦等の植物性タンパク質を原料として得られる、Hydrolyzed Vegetable Protein (以下HVP) と、ゼラチン、乳カゼイン等の動物性タンパク質を原料として得られるHydrolyzed Animal Protein (以下HAP) があり、その主成分であるアミノ酸組成が原料により大きく異なり、旨味、甘味等に影響を及ぼす。

【0006】しかし、近年では原料の調味を有効に生かすためにプロテアーゼなどの酵素を利用した製造法も考案されている。酵素分解型調味料としてはこれまでに、

卵白分解物の製造法 (特開昭48-68773号)、脱脂大豆より得る調味液の製造法 (特開昭51-70852号)、チーズホエーを原料とする調味料の製造法 (特開昭62-151155号)、コーングルテンミール加水分解物の製造法 (特公平2-295437号) などが報告されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、従来から分解しにくいために利用価値の低いケラチン含有タンパク質、即ち、鳥羽毛、獣毛、人毛、などが温和な条件下で分解できれば、廃棄物の減少や加工副産物による環境汚染等も解決され、同時に旨味、甘味を呈するアミノ酸を多く含有する分解物を得ることができると考えた。

【0008】しかしながら、ケラチン含有タンパク質は

(4)

特開平6-46871

5

それがもつ難分解性という性質のためにこれまで天然調味料の原料として注目されることはなかった。また、ケラチン含有タンパク質を効率的にアミノ酸にまで分解する方法も知られていなかった。

【0009】一般に酸加水分解によりHAPを得る場合、反応条件は100℃、1-2日間かかり、高温、長時間の反応はエネルギー消費量が大きい。さらに、酸によるタンパク質の加水分解は腐蝕である一方、臭気の発生やアミノ酸の過剰（破壊）分解、副反応による有害物質の形成、中和のために高塩分となることなどの欠点がある。

【0010】一方、本発明に用いられるケラチン含有タンパク質は全般的にグルタミン酸、やグリシン、セリン、アラニンなど側鎖の短いアミノ酸が多い。即ち旨味、甘味を呈するアミノ酸を多く含有し天然調味料素材として好ましい。しかしながらその構造上多数のS-S架橋構造をペプチド鎖間につくり、緻密な構造のもの、無定型のもの、あるいはその混合であり、酵素分解を行う場合、従来のフィシン、パバインなど通常のプロテアーゼでは分解されにくいという欠点がある。

【0011】したがって、中性あるいはアルカリ性の温和な条件下でケラチン含有タンパク質を分解する方法が待ち望まれているのが現状である。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記問題点であるケラチン含有タンパク質の分解を温和な条件で行うべく鋭意研究を行ったところ、目的に応じて適切な酵素を選択することにより上記課題を解決し、本発明を完成に至らしめた。即ち、本発明は、ケラチン含有タンパク質をケラチナーゼで消化し、続いてカルボキシペプチダーゼ及び/またはアミノペプチダーゼを用いて消化することを特徴とするグルタミン酸、アラニン、グリシン、セリン含有率の高いタンパク質加水分解物の製造法であり、また、ケラチナーゼが*Bacillus licheniformis* FWD-1由来のものである前記タンパク質加水分解物の製造法である。

【0013】本発明で用いられるケラチン含有タンパク質とは鳥羽毛、獣毛、人毛、のいずれか1、もしくは2種類以上のケラチン含有タンパク質を示し、好ましくは界面活性剤等で脱脂を行ったものが良い。その他のタン

パク質や血液などの混合物の場合も除外しない。
【0014】次に、本発明で用いられるケラチナーゼは特にその起源は問わない。従って、ケラチンを特異的に分解する活性（ケラチナーゼ活性）を持つ限り、動物、植物、微生物由来のものが用いられる。しかし、好ましくは、*Bacillus licheniformis* FWD-1により生産されたケラチナーゼが良い。*Bacillus licheniformis* FWD-1は米国ノースカロライナ州立大学の J.C.H.Shih 教授らが養鶏場の羽毛廃棄物中より発見した菌である（C.M.Williams et al., Appl. Environ. Microbiol., 56,1509 (19

6

99)）。本菌はすでに寄託されており（ATCC No.53757）、US Patent4,908,220 に記載されている。本菌を利用して羽毛を含んだ家畜廃棄物の分解（C.M.Williams et al., J. Appl. Bacteriol., 67, 25(1989)）や、フエザーミールの消化率向上（C.M.Williams et al., Poultry Science, 70, 85(1991)）といった研究がなされている。

【0015】本発明に用いられるカルボキシペプチダーゼ、アミノペプチダーゼは具体的には植物、動物、微生物界に広く分布するロイシンアミノペプチダーゼ、アミノペプチダーゼM、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼYなどペプチド鎖のいずれかの末端から順次アミノ酸を1個ずつ遊離するエキソペプチダーゼである。一般的に食品タンパク質をプロテアーゼで分解処理するとロイシンが末端に存在するような苦味ペプチドが生成し、風味が著しく低下することが知られている。そこで、この苦味ペプチドを各種のペプチダーゼで分解することによりアミノ末端やカルボキシル末端からアミノ酸を遊離させて旨味性を向上させる試みがなされている（石田ら、食品工誌、23, 524-530 (1976)）。本発明においてはケラチナーゼでケラチン含有タンパク質をペプチドにまで分解し、続いて上記ペプチダーゼの作用でアミノ酸にまで分解する。従って本来ケラチンに多く含有する、旨味を呈するグルタミン酸、甘味を呈するグリシン、アラニンなどのアミノ酸を遊離させることによって、著しい旨味向上が期待できる。

【0016】本発明に関わる酵素の生産は、以下の実施例に記載されているような、微生物の菌体や培養液、または動物や、植物の組織から調製する方法に限定されるわけではなく、発現ベクターに接続された該酵素の遺伝子が導入された大腸菌、枯草菌や酵母などより組換えDNA法によって生産することも可能であり、また野生型遺伝子に代えて変異した遺伝子を染色体に相同組換えを利用して導入した細胞より調製することも可能である。いずれの方法を用いて生産された酵素も同程度の効果は期待できる。また、酵素の精製法も特に限定しない。

【0017】また本発明に関わる原料のケラチン含有タンパク質は酵素処理前の調製を特に限定しないが、好ましくは0.5-5%の界面活性剤水溶液などで脱脂されたものが望ましい。

【0018】分解反応の条件は例えば原料の羽毛を蒸留水で洗浄したのち120℃、20分加圧滅菌し、常温に戻した羽毛に対し*Bacillus licheniformis* FWD-1により生産されたケラチナーゼを0.1-10%の酵素溶液として2-48時間、37℃-45℃で振盪し反応させる。この時、酵素溶液は緩衝液でpH5-9に調整するのが望ましい。また精製された酵素を用いてもよく、また組換え製品を用いてもよい。続いて、羽毛に対しシグマ社のロイシンアミノペプチダーゼ（ブタ腎臓由来）などのアミノペプチダーゼ及び/あるいは同じくシグマ社のカルボキシペプチダー

(5)

特開平6-46871

7

ゼY (パン酵母由来) などのカルボキシペプチダーゼを反応液に0.1~10%添加し、2~48時間、37℃で振盪し反応させ、加水分解物を得る。未反応の原料等の不溶物は遠心分離や濾過など従来の分離法を用いて除去すればよい。以下実施例をもって、*Bacillus licheniformis* FWD-1由来のケラチナーゼの調製方法、酵素化学的性質、さらにはケラチン含有タンパク質加水分解物の製造法について示す。

【0019】

【実施例】

【0020】< 実施例1. *Bacillus licheniformis* FWD-1由来のケラチナーゼの調製法>ケラチン含有寒天培地 (塩化アンモニウム 0.05%, 塩化ナトリウム 0.05%, リン酸水素二ナトリウム 0.03%, リン酸二水素カリウム 0.04%, 塩化マグネシウム 0.01%, 酵母エキス 0.01% フェザーミール 1%, 寒天 1.5%) で生育させた *Bacillus licheniformis* FWD-1株を、ケラチン含有液体培地 (塩化アンモニウム 0.05%, 塩化ナトリウム 0.05%, リン酸水素二ナトリウム 0.03%, リン酸二水素カリウム 0.04%, 塩化マグネシウム 0.01%, 酵母エキス 0.01% フェザーミール 1%) に接種し、坂口フラスコで pH 7.5、50℃にて24時間振とう培養を行った。

【0021】本培養で得た培養上清から以下の方法でケラチナーゼを精製した。

【0022】1. 硫酸塩析: まず、培養液遠心上清 (200ml) を氷冷下、70%硫酸溶液となるように徐々に飽和硫酸溶液を添加し、4℃で一晩放置した。生じた沈澱を遠心分離し、回収した。

【0023】2. 透析: 続いて、沈澱を少量の (10ml) の 20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.8) に溶かし、同緩衝液にて透析を行った。透析は氷冷下、酵素溶液の約200倍量の緩衝液を4回交換 (2hr×2, 14hr, 2hr) して行った。

【0024】3. 陰イオン交換: 次に、DEAE Sephadex A-25 (ファルマシアKB社製) を用いる陰イオン交換樹脂で処理した。すなわち、試料 (13ml) に約5ml の DEAE Sephadex A-25 を懸濁させ、氷冷下ゆっくりと攪拌した。4hr後、ガラスフィルターで樹脂を濾過して除いた。または DEAE Mem-Sep (ミリポア社製) に繰り返し通し通しさせることによって、さらに効率よく処理が行えた。この結果、薄茶色に着色していた試料が無色になっ

た。

【0025】4. 緩衝液の置換: DEAE処理後、試料 (17ml) を Sephadex G-25 のカラム (PD-10) (ファルマシアKB社製) を用いて、7回に分けて 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 6.2) へと、塩の交換を行った。

【0026】5. 陽イオン交換: さらにこの試料を Sep-Pak Accell CM (ミリポア社製) あるいは CM Mem-Sep (ミリポア社製) と FPLC を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーに付した。pH 6.2 の 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液でカラムを洗浄した後、溶出は Sep-Pak Accell C

8

MC は pH 5.2 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液 20mM NaCl、pH 6.8 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液 20mM NaCl、pH 6.8 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液 200mM NaCl、pH 6.8 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液 1M NaCl で段階的に溶出した。FPLCを用いる方法では直線グラジエントで pH 6.8 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液の NaCl 濃度を 20mM から 1M まで変化させて溶出した。ケラチン分解活性は Sep-Pak Accell CM を用いたとき pH 6.8 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液 200mM NaCl、および pH 6.8 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液 1M NaCl 画分に溶出され、CM Mem-Sep を用いた場合には、直線グラジエントで pH 6.8 20mM ナトリウム-リン酸緩衝液の NaCl 濃度が 20mM から 80mM の間に溶出された。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製度を鑑別を行った結果、分子重約 30,000 の位置に 1 本のバンドが検出された。これを精製酵素として以後の実験に供した。また硫酸沈澱物も粗酵素として適宜使用した。本酵素の製造は上記方法に限定されているわけではなく、例えば、培養液を限外濾過膜などを用いて菌体を除去、濃縮後、アルコール沈澱したもの

20

を凍結乾燥することによっても得られる。

【0027】酵素活性は基質にケラチン (牛蹄、角由来、ICN BIOMEDICALS, INC.)、あるいはカゼイン (牛乳由来、純正化学) を用い、基質 20mg に対して各酵素試料溶液 1ml を加え、37℃、約 130rpm で振とうした。各酵素試料溶液 1ml に含まれる酵素タンパク質の量は Bio-rad 社プロテインアッセイキットおよび Warburg の方法 (A. Warburg et al., Biochem. Z., 310, 384 (1941)) により測定した。振とう 1 時間後、2ml トリクロロ酢酸溶液 (0.11M TCA, 0.22M CH₃COONa, 0.33M CH₃COOH) を加え酵素反応を停止させた (このとき未反応の基質及び酵素タンパク質は沈澱される)。15 分間室温で放置した後 15,000rpm、10 分遠心分離を行い沈澱を除去した後、上清の 275nm における吸光度を測定した。この 275nm の吸収は遊離ペプチドあるいはアミノ酸によるものであるため吸光度が大きいものほど酵素の活性が高いこととなる。反応液中に含まれていた酵素タンパク質 1mg 当りの吸光度を各タンパク質分解活性とした (A₂₇₅/mg)。以上、この方法を活性測定法 A とする。

【0028】また、萩原らの方法 (B. Hagihara, H. Matubara, M. Nakai, and K. Okunuki, J. Biochem., 45, (3), 185 (1958)) は、プロテアーゼの分解活性の測定方法として当業界でオーソライズされたものであるが、この方法ではカゼインが基質として用いられる。この方法によっても、本酵素の分解活性を測定した (Caseinolitic act. (U/mg/min))。

【0029】上記 2 種類の方法によって測定した各精製段階の酵素活性を表 2 に示す。

【0030】

【表 2】

(6)

特開平6-46871

9

10

各種製ステップでの酵素活性

		培養上清	沉淀沈殿 (粗酵素)	DEAE sephadex A-25	Sep-Pak Accell CM
a	全酵素液量 (ml)	200	13	17	24
b	含有DNA質量 度 (ng/ml)	6.3	1.9	6.6	0.95
c	含有DNA質量 (ng)	50	25	10	1.2
d	酵素活性(基質 A275)(A275/mg)	9	40	45	132
e	酵素活性(基質 A275)(A275/mg)	40	50	51	60
f	d / e	0.22	0.80	0.88	2.2
g	Caseinolytic act. (U/mg/min)	90	50	140	450

【0031】＜実施例2. *Bacillus licheniformis* FWD-1由来のセラチナーゼの酵素化学的諸性質の特定＞*Bacillus licheniformis* FWD-1由来のセラチナーゼの酵素化学的諸性質を表3にまとめた。

【0032】このとき基質にはセラチン(牛蹄、角由来)を用いた。分解活性の評価は、実施例1の活性測定法A同様に行った。

【0033】*Bacillus licheniformis* FWD-1由来のセラチナーゼの1次構造をアミノ基末端側21残基まで決定した。すなわち、Laemmli電解液を用いたSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(10-20%グラジエントゲル：第一化学薬品(株) SDS-PAGEプレート10/20)にて泳動した約30 kDaの精製酵素をタンパク質をPVDF膜(BIO-RAD社)に転写した。続いて、P-TF膜をクマースープリリアントブルー染色後、目的のタンパク質のバンド(分子量約30, 000)を切り出し、プロテインシーケンサー(ABI社430A)にてアミノ基末端側1次配列を決定した。結果を

配列表配列番号1に示す。

【0034】至適pHの測定は各pHの緩衝液中、基質に牛蹄、角セラチンを用い活性測定法Aに準じて(酵素タンパク濃度0.025mg/ml)行った。測定結果のグラフを図1、図2に示す。

【0035】至適温度の測定は活性測定法Aに準じて(酵素タンパク濃度0.025mg/ml)各測定温度で行った。測定結果のグラフを図3、図4に示す。

【0036】pH安定性は酵素溶液(酵素タンパク濃度0.2mg/ml)を各測定pHで調整し、4℃、1時間インキュベートした。その後、pH8.0の緩衝液中で活性測定法Aに準じて(酵素タンパク濃度0.025mg/ml)活性を測定した。測定結果のグラフを図5、図6に示す。

【0037】温度安定性はpH8.0の緩衝液中の酵素溶液(酵素タンパク濃度0.2mg/ml)を各温度でインキュベート後、活性測定法Aに準じて(酵素タンパク濃度0.025mg/ml)活性を測定した。測定結果のグラフを図7、図8

40

50

(7)

特開平6-46871

11

12

に示す。

【0038】 溶液中での保存安定性はpH5.0、4℃で酵素
 溶液（タンパク濃度精製酵素で0.5mg/ml、粗酵素で0.2mg
 /ml）を静置、各時間ごとに活性測定法Aに準じて（タ *

* ンパク濃度0.025mg/ml）活性を測定した。測定結果のグ
 ラフを図9に示す。

【0039】

【表3】

Bacillus licheniformis PWD-1により生産されたケラチナーゼ

の酵素化学的性質

	粗 酵 素	精 製 酵 素
至適pH	8.5	8.5-9.0
至適温度	45℃	45℃
安定pH域	pH5.0-12.0(>80%)	pH5.2-13.0(>80%)
温度安定性(50%失活)	60℃(Ca ⁺)、55℃(Ca ⁻)	50℃(Ca ⁺ , -)
溶液(pH5.0)保存性	8日間で18%失活	8日間で58%失活
分子量	約 80000(ゲル電気泳動による測定)	

【0040】<実施例3. *Bacillus licheniformis* PWD-1由来のケラチナーゼの分解活性の検定>本発明者らは今回調製した精製酵素、または硫酸沈殿後の粗酵素を用いて本酵素のケラチン分解能を他の酵素と比較し、評価した。すなわち、以下に述べるように、ケラチン/カゼインの相対活性の比較や各種ケラチン酵素処理液のアミノ酸組成の比較などを調べた。

【0041】まず、実施例1で述べた方法に従って調製した*Bacillus licheniformis* PWD-1由来のケラチナーゼと5種類の酵素（サチライシン Carlsberg(シグマ社)、パバイン(シグマ社)、*Clostridium* コラゲナーゼ(シグマ社)、プロテアーゼ K(天野製薬(株))、プロテイナーゼ K(和光純薬(株))）についてケラチンとカゼインに対

する分解活性を比較した。各酵素の反応条件は、実施例1で採用した条件と同じである。ただし各酵素試料溶液は、基質20mgに対して各酵素0.050mg添加し評価した。

【0042】それぞれの分解活性は酵素反応上清の275nmにおける吸光度を酵素mgタンパク質あたり求め比較した。結果を表4に示した。この結果より本酵素はカゼインの相対的分解能の活性は最も高く、ケラチン分解能が優れていると考えられる。次いで、サチライシン Carlsbergのカゼインに対するケラチンの相対的分解能の活性が高かった。

【0043】

【表4】

(8)

特開平6-46871

13

14

各種酵素のケラチン、カゼイン分解活性の比較

酵素	ケラチン (A275/mg)	カゼイン (A215/mg)	ケラチン/カゼ イン
ケラチナーゼ	132	80	2.20
サチライシン carlsberg	290	210	1.10
パパイン	20	120	0.17
Clostridium コラゲナーゼ	-	20	-
プロテアーゼ M	80	430	0.18
プロテアーゼ K	70	430	0.16

【0044】さらに、各種ケラチン含有タンパク質に対するケラチナーゼの効果を他酵素と比較する方法を以下のように行った。

【0045】ケラチン含有タンパク質として、羽毛、人毛、ケラチンパウダー、ケラチン（牛蹄、角由来）の3種を選択し、これらに対してケラチナーゼ、エラスターゼ、サチライシン Carlsberg、プロテアーゼ M、それぞれを37℃、24時間反応させた。なお、ケラチナーゼは実施例1で述べた方法に従って、*Bacillus licheniformis* PWD-1により調製したものであり、エラスターゼはアルカリ性バチルス属細菌Y2-8株の培養上清液の硫酸沈着物から調製したものである（特開平7-224465号）。どの酵素の反応も至適に近いpHで行った。即ち、ケラチナーゼ、サチライシン Carlsberg, protease MはpH8.0、エラスターゼはpH10.5で処理を行った。また、基質50mgに対して、酵素溶液はタンパク濃度でケラチナーゼ0.010mg/2ml、サチライシン Carlsberg 0.0025mg/2ml、protease M 0.050mg/2ml、荻原による方法に鑑じたカゼイン分解活性でいずれも5 Unit/mgの酵素を添加した。酵素処理上清を20%塩酸（定沸点塩酸）でアンブル中110℃、24時間加水分解を行い、アミノ酸分析を行った。

【0046】結果を比較するために、各アミノ酸についてプロテアーゼ Mのアミノ酸分析値との比をとった。図10～12にその結果を示す。この結果より本ケラチナーゼは羽毛ケラチンに対する分解能が他酵素と比べて著しいと考えられる。

【0047】＜実施例4＞ケラチナーゼによる羽毛の分解＞本実施例ではケラチナーゼを用いた羽毛の分解を遊離アミノ酸の定量で調べた。実施例3同様、ケラチナーゼは実施例1で述べた方法に従って、*Bacillus licheniformis* PWD-1により調製したものである。また、ペプチダーゼはシグマ社のロイシンアミノペプチダーゼ及びシグマ社のカルボキシペプチダーゼYを用いた。さらに比較としてシグマ社のパパイン（パパイヤ由来）も用いた。

【0048】まず、鶏羽毛を蒸留水で洗浄したのち120℃、20分加圧滅菌した羽毛を原料に用いた。この羽毛50mgに対し*Bacillus licheniformis* PWD-1により生産されたケラチナーゼ100μg（49Unit/min）、シグマ社のパパイン（パパイヤ由来）100μg（90Unit/min）のいずれかを2mlの蒸留水中2時間、37℃で振盪し反応させる。

続いて、ペプチダーゼを添加する場合はシグマ社のロイ

(9)

特開平6-46871

15

シンアミノペプチダーゼ（ブタ腎臓由来）300 μ g（60Unit）あるいはシグマ社のカルボキシペプチダーゼY（パン酵母由来）300 μ g（32Unit）を反応溶液に添加し、2時間、37°Cで振盪し反応させた。4mlのトリクロロ酢酸溶液（0.11M TCA、0.23M CH₃COONa、0.33M CH₃COOH）を加え反応を停止させ、遠心分離により未分解の基質や、酵素タンパク質を除去して、上清のアミノ酸を分析定量*

酵素処理により遊離したアミノ酸量

16

*した。表5に特徴的なアミノ酸の結果を示した。なお、上記酵素の単位はケラチナーゼ、パパインは実施例1に挙げた萩原らによるカゼイン分解活性単位を、ロイシンアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼYでは酵素で定められた活性単位を示した。

【0049】

【表5】

処理	アミノ酸 (μ mol/dl)						
	Ser	Thr	Glu	Gly	Ala	Val	Leu
無処理	-	-	1	1	-	-	-
ケラチナーゼ	1	1	-	2	3	2	3
ロイシンアミノペプチダーゼY	3	3	7	2	5	5	8
カルボキシペプチダーゼY	8	6	13	11	13	10	11
パパイン	-	-	2	1	1	1	1
ロイシンアミノペプチダーゼY	1	2	4	2	3	3	3
カルボキシペプチダーゼY	1	-	4	1	1	1	2

【0050】ケラチナーゼ単独処理では無処理に比べると遊離アミノ酸の量に大きな変化はなかったが、ペプチダーゼとの混合処理により甘味系アミノ酸であるアラニン、グリシン、セリン、スレオニンが明らかに増加していた。特にロイシンアミノペプチダーゼとの併用使用がケラチナーゼにおいて優れていた。また、旨味を呈するグルタミン酸も増加していた。いずれの場合もパパインより優れたアミノ酸遊離を示した。

【0051】

【発明の効果】以上示した様に本発明は利用価値が低く従来の酵素では分解されにくいケラチン含有タンパク質を中性～アルカリ性の温和な条件下ケラチナーゼを用い、更にカルボキシペプチダーゼ及び/またはアミノペプチダーゼを用いて分解し、グルタミン酸、アラニン、グリシン含有率の高い旨味性に優れたタンパク質加水分解物を得ることができる。また、同時に、廃棄物処理の問題、酸分解法に伴う副生成物の問題も解決し得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】各pHで精製酵素の活性を測定したものである。1mM塩化カルシウムの有無も比較した。最も活性の高い点を100として相対比較で表した。

【図2】各pHで粗酵素（醗安沈澱物）の活性を測定したものである。1mM塩化カルシウムの有無も比較した。最

も活性の高い点を100として相対比較で表した。

【図3】各温度で精製酵素の活性を測定したものである。1mM塩化カルシウムの有無も比較した。最も活性の高い点を100として相対比較で表した。

【図4】各温度で粗酵素（醗安沈澱物）の活性を測定したものである。1mM塩化カルシウムの有無も比較した。最も活性の高い点を100として相対比較で表した。

【図5】各pHで保存後の精製酵素の活性を測定したものである。1mM塩化カルシウムの有無も比較した。最も活性の高い点を100として相対比較で表した。

【図6】各pHで保存後の粗酵素（醗安沈澱物）の活性を測定したものである。1mM塩化カルシウムの有無も比較した。最も活性の高い点を100として相対比較で表した。

【図7】各温度で保存後の精製酵素の活性を測定したものである。1mM塩化カルシウムの有無も比較した。最も活性の高い点を100として相対比較で表した。

【図8】各温度で保存後の粗酵素（醗安沈澱物）の活性を測定したものである。1mM塩化カルシウムの有無も比較した。最も活性の高い点を100として相対比較で表した。

【図9】酵素溶液の保存性を活性を追ってみたグラフである。精製酵素と粗酵素（醗安沈澱物）を比較した。

(10)

特開平6-46871

17

【図10】ケラチナーゼ、エラスターゼ、サチライシン Carlsbergそれぞれで羽毛を処理した上清の加水分解物のアミノ酸組成を、プロテアーゼ Nで処理した上清の加水分解物のアミノ酸組成を基準にして比較したグラフである。図中のアルファベットはアミノ酸の略語である。以下にその対応を示す(図11、12において同じ)。

D アスパラギン酸+アスパラギン
T スレオニン
S セリン
E グルタミン酸+グルタミン
P プロリン
G グリシン
A アラニン
V バリン
C シスチン
M メチオニン
I イソロイシン
L ロイシン
Y チロシン
F フェニルアラニン

*K リジン
H ヒスチジン
R アルギニン

【図11】ケラチナーゼ、エラスターゼ、サチライシン Carlsbergそれぞれでケラチン(牛角、蹄由来)を処理した上清の加水分解物のアミノ酸組成をプロテアーゼ Nで分解したものを基準にして比較したグラフである。

【図12】ケラチナーゼ、エラスターゼ、サチライシン Carlsbergそれぞれで人毛を処理した上清の加水分解物のアミノ酸組成をプロテアーゼ Nで分解したものを基準にして比較したグラフである。

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 21

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源

生物名: *Bacillus licheniformis* P4D-1 (ATCC No.5375)

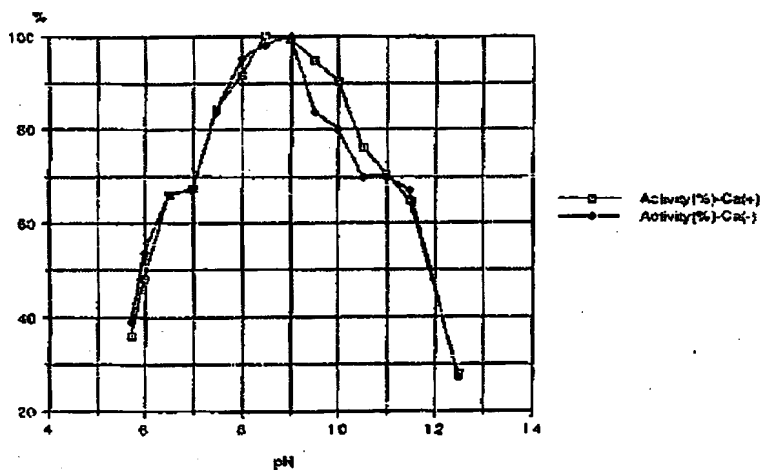
20 7)

*

配列

Ala	Gln	Thr	Val	Pro	Tyr	Gly	Ile	Pro
Leu	Ile	Lys	Ala	Asp	Lys			
1				5				
10						15		
Val	Gln	Ala	Gln	Gly	Phe			
				20				

【図1】

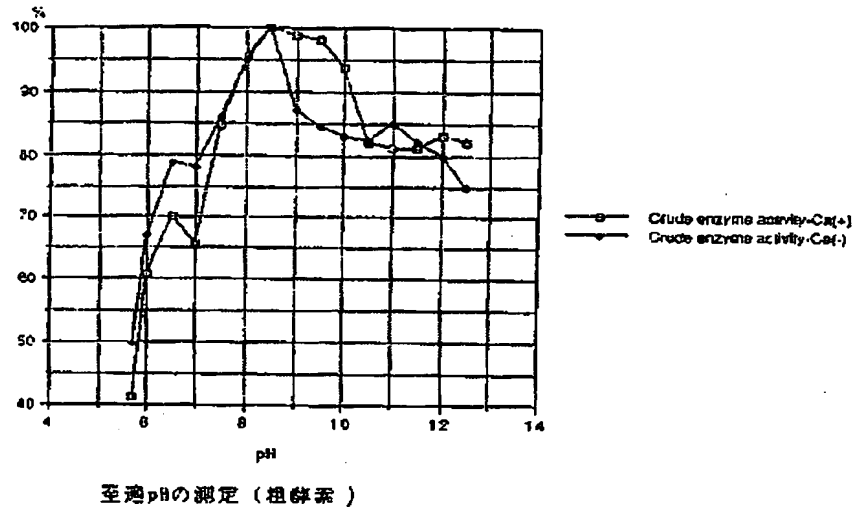


至適pHの測定(精製酵素)

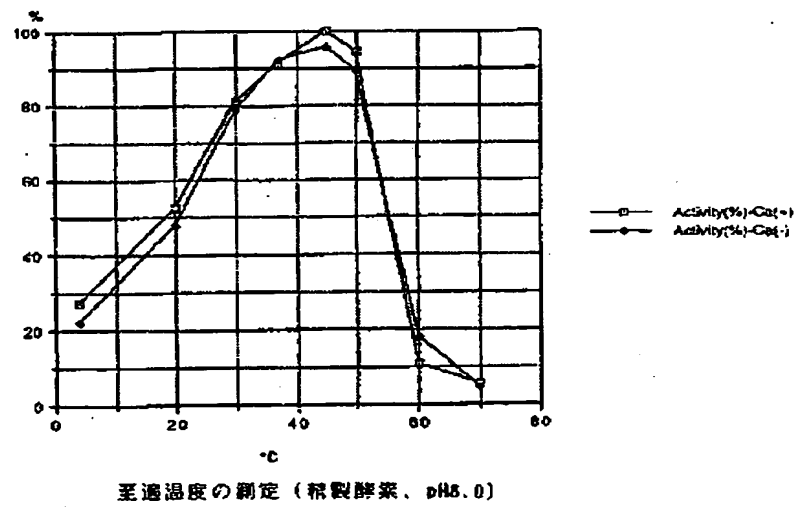
(11)

特開平6-46871

【図2】



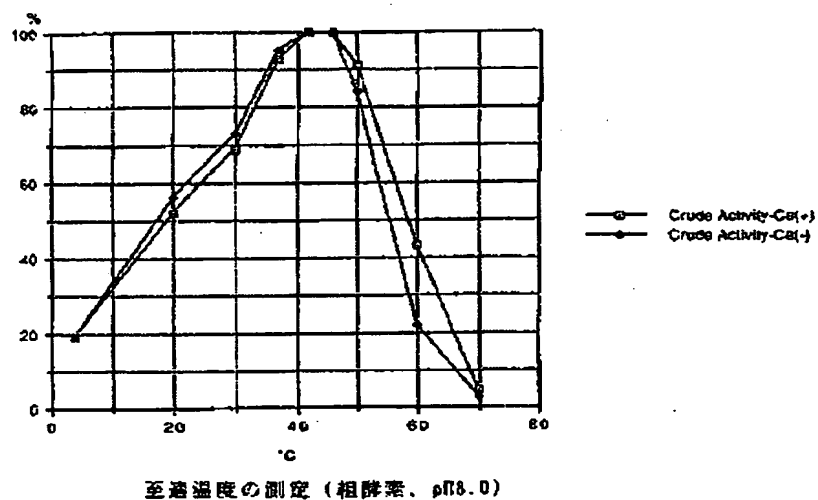
【図3】



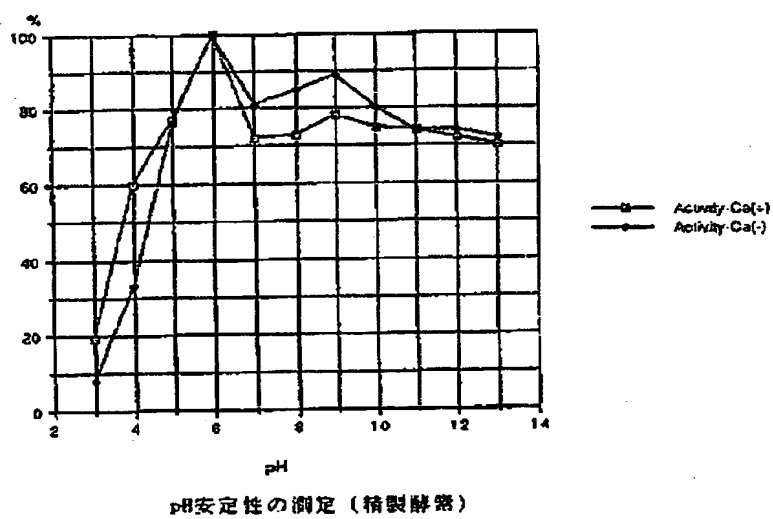
(12)

特開平8-46871

【図4】



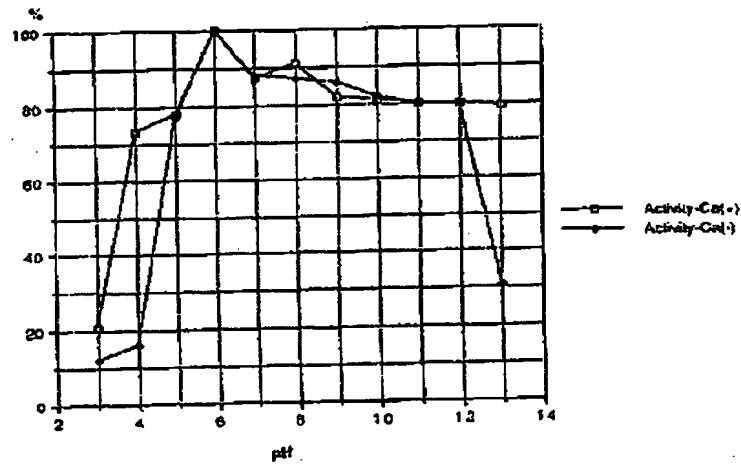
【図5】



(13)

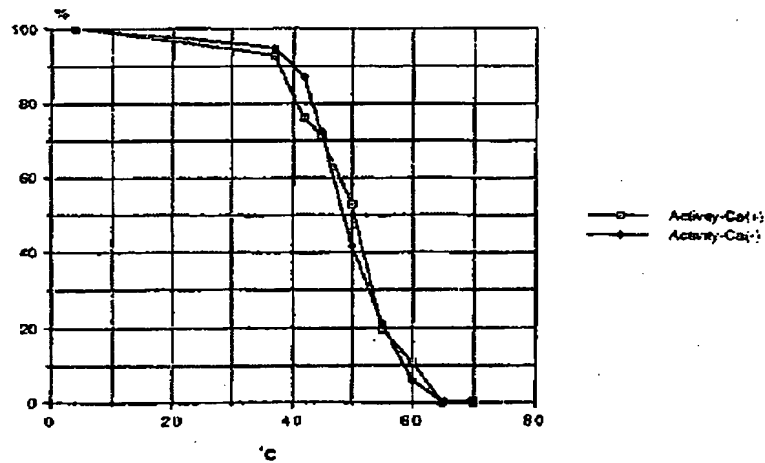
特開平6-46871

【図6】



pH安定性の測定（粗酵素）

【図7】

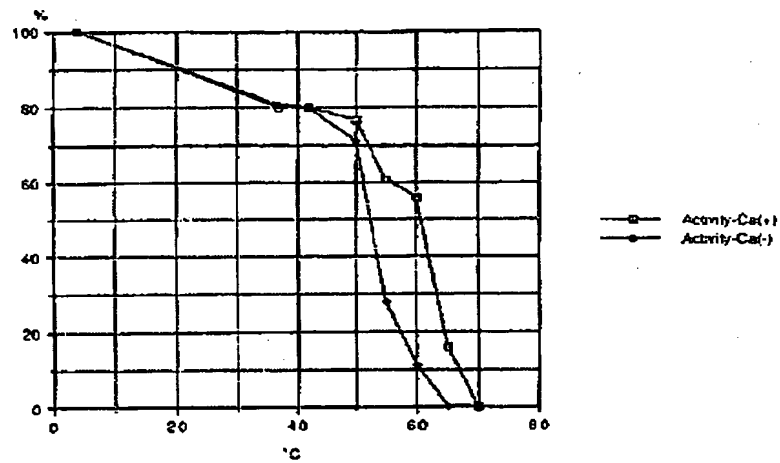


温度安定性の測定（精製酵素、pH8.0）

(14)

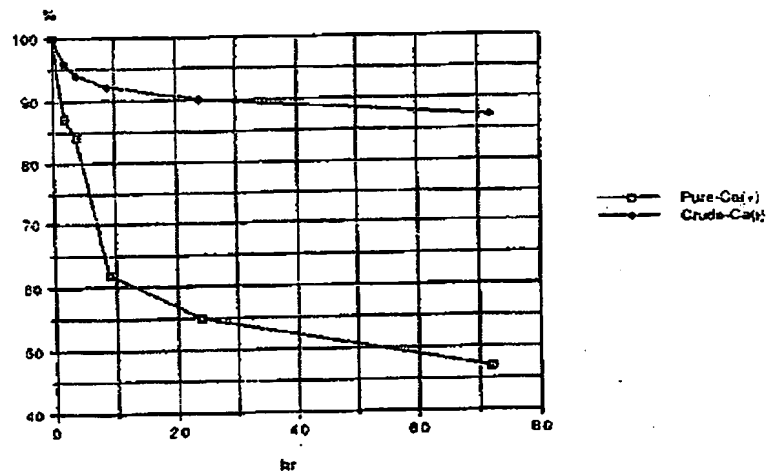
特開平8-46871

【図8】



温度安定性の測定 (粗酵素、pH8.0)

【図9】

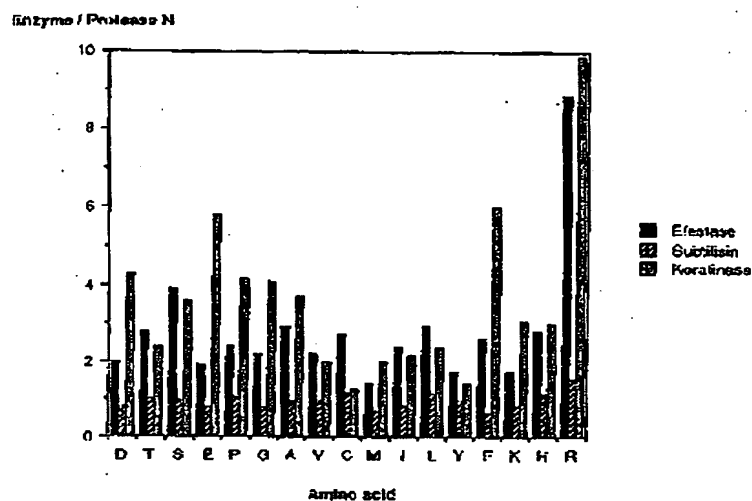


溶液の保存安定性の測定 (pH6.0)

(15)

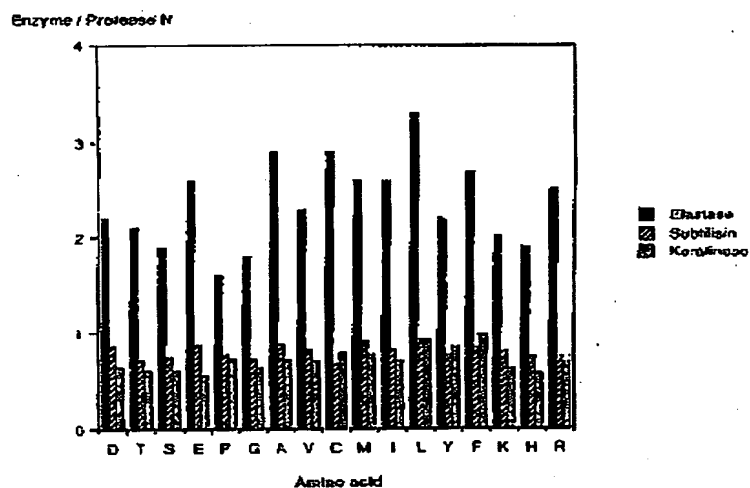
特開平6-46871

【図10】



各酵素による羽毛処理上清の酸加水分解物のアミノ酸
比較 (protease Nとの比較)

【図12】

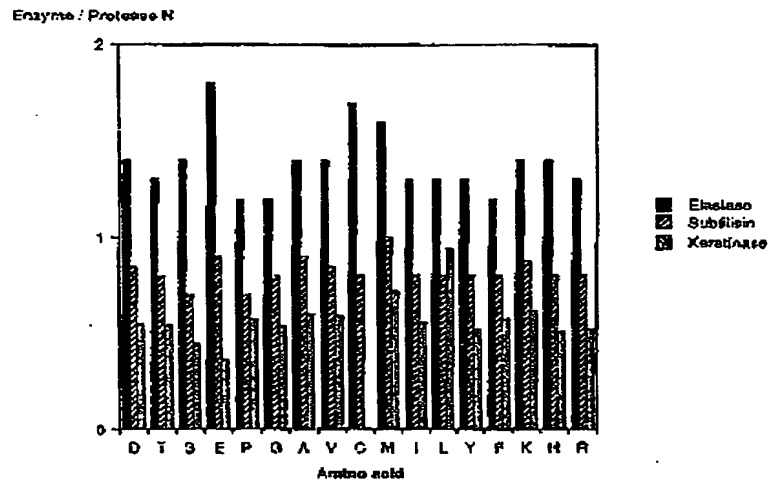


各酵素によるhuman keratin処理上清の酸加水分解物の
アミノ酸比較 (protease Nとの比較)

(16)

特開平6-46871

【図11】



各酵素によるbovine keratin処理上清の酸加水分解物の
アミノ酸比較 (protease Nとの比較)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/08	C	8931-4B		
	D	8931-4B		
13/14	A	8931-4B		
// C 1 2 N 9/56	ZNA	9161-4B		
(C 1 2 P 13/00				
C 1 2 R 1:10)				
(C 1 2 P 13/04				
C 1 2 R 1:10)				
(C 1 2 P 13/06				
C 1 2 R 1:10)				
(C 1 2 P 13/08				
C 1 2 R 1:10)				
(C 1 2 P 13/14				
C 1 2 R 1:10)				

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.